

• 论 著 •

自动化磁珠法标本制备联合液相色谱串联质谱检测 人血清中 25-羟基维生素 D 的性能评价

卢 山,董辉苒,任文华,苏 玉,李春艳,万极硕,吴 俊[△]

北京积水潭医院检验科,北京 100035

摘 要:目的 评估自动化磁珠法(MSPE)提取 25-羟基维生素 D[25-(OH)D]及联合液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)检测 25-(OH)D₂、25-(OH)D₃ 的性能。方法 采用 MSPE 提取血清中的 25-(OH)D₂ 和 25-(OH)D₃,并联合 LC-MS/MS 检测 25-(OH)D₂、25-(OH)D₃ 的线性、定量限、回收率、精密度及基质效应。收集 120 例临床剩余血清标本,同时采用 MSPE、液液萃取法(LLE)和固相支撑液液萃取法(SLE)这 3 种方法进行提取,经 LC-MS/MS 测定后比较 MSPE 分别与 LLE、SLE 结果的一致性。结果 MSPE 提取 25-(OH)D₂、25-(OH)D₃ 的线性均 >0.99 ;定量限分别为 0.4 ng/mL、0.9 ng/mL;重复精密度分别在 5.3%~6.5%、5.1%~6.8%;实验室内总不精密度分别在 7.3%~10.6%、6.1%~8.0%;相对回收率分别在 97.0%~104.0%、96.5%~106.3%;与预期浓度百分偏差均在 15%以内。LLE、SLE 和 MSPE 提取 25-(OH)D₂ 和 25-(OH)D₃ 结果的相关性均较好($r>0.98$),相对百分偏差在 15%以内。结论 该研究中 MSPE 前处理提取 25-(OH)D₂、25-(OH)D₃ 性能良好,有望提高临床检测自动化及通量。

关键词:自动化磁珠法;液相色谱串联质谱; 25-羟基维生素 D₂; 25-羟基维生素 D₃

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.10.017 **中图法分类号:**R-331

文章编号:1673-4130(2022)10-1234-05 **文献标志码:**A

Performance evaluation of automated magnetic bead-based specimen preparation combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the detection of 25-hydroxyvitamin D in human serum

LU Shan, DONG Huiran, REN Wenhua, SU Yu, LI Chunyan, WAN Jishuo, WU Jun[△]

Department of Clinical Laboratory, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China

Abstract: Objective To evaluate the performance of 25-hydroxyvitamin D[25-(OH)D] by automated magnetic bead method (MSPE) and the detection of 25-(OH)D₂, 25-(OH)D₃ by combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** The linearity, limit of quantification, recovery, precision and matrix effect of 25-(OH)D₂ and 25-(OH)D₃ in serum were extracted by MSPE combined with LC-MS/MS. A total of 120 clinical residual serum samples were collected and extracted by three methods: MSPE, liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase supported liquid-liquid extraction (SLE). The consistency of MSPE, LLE and SLE results were compared after LC-MS/MS determination. **Results** The linearity of MSPE extraction of 25-(OH)D₂ and 25-(OH)D₃ were all >0.99 ; the limits of quantification were 0.4 ng/mL and 0.9 ng/mL, respectively; the repeat precision were 5.3%~6.5%, 5.1%~6.8%, respectively; the total imprecision in the laboratory were 7.3%~10.6% and 6.1%~8.0%, respectively; The relative recoveries were 97.0%~104.0% and 96.5%~106.3%, respectively; the percentage deviation from the expected concentration was within 15%. The correlations of 25-(OH)D₂ and 25-(OH)D₃ extracted by LLE, SLE and MSPE were all good ($r>0.98$), and the relative percentage deviation was within 15%. **Conclusion** In this study, MSPE pretreatment has good performance in extracting 25-(OH)D₂ and 25-(OH)D₃, which is expected to improve the automation and throughput of clinical detection.

Key words: automated magnetic bead method; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; 25-hydroxyvitamin D₂; 25-hydroxyvitamin D₃

维生素 D 作为人体必需的营养素,对人体钙和磷的正常代谢有直接影响。维生素 D 缺乏十分常见,因此维生素 D 水平的准确检测对多种钙代谢相关疾病

的预防和治疗有着重要的意义。维生素 D 在血液循环中的主要形式以 25-羟基维生素 D[25-(OH)D]呈现,其半衰期最长,浓度最高,且最稳定,能反映人体

的维生素 D 总量。25-(OH)D 的主要形式为 25-(OH)D₂ 和 25-(OH)D₃, 所以评价体内维生素 D 营养状况最为有效的指标是血清中 25-(OH)D₂ 和 25-(OH)D₃ 水平^[1]。

近年来, 维生素 D 的检测越来越受到人们的重视。国家在 2015 年发布了血清中 25-(OH)D₃ 检测的行业标准^[2]。目前液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)有通用性强、特异度和灵敏度高的优势, 可以同时检测 25-(OH)D₂ 和 25-(OH)D₃, 是国际上维生素 D 检测的金标准^[3-10]。然而在临床检测维生素 D 的过程中, LC-MS/MS 存在的问题是前处理过程复杂。目前多数实验室是通过手工操作完成加样和取样步骤, 临床操作人员需要较高的技能要求, 因此容易出现人为失误导致检测结果不好。近年来, 自动化磁珠法(MSPE)标本制备的出现有望将 LC-MS/MS 技术发展成为前处理和检测一体的全自动检测方法, 受到临床的极大重视, 该法前处理过程简单, 可节省人力和时间成本。因此, 本研究评估了使用 MSPE 进行标本前处理后 25-(OH)D₂ 和 25-(OH)D₃ 的检测结果, 并与液液萃取法(LLE)和传统固相支撑液液萃取法(SLE)检测结果进行比较, 以期临床选择不同的标本处理方法提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料来源 血清标本为当天临床检测剩余血清, 选取避免溶血、乳糜、黄疸的 120 份临床血清标本分装后于 -20 °C 冰箱保存待用。

1.2 仪器与试剂 LC-MS/MS 系统(美国 AB SCI-EX); 自动化磁珠法质谱标本前处理系统 ZPTQ 32(北京梅斯质谱生物); 低速离心机(北京京立); 微孔板振荡器、氮吹仪(杭州奥盛仪器); LLE 的 25-(OH)D 测定试剂盒(江苏豪思生物)。SLE 所用提取板为 Cleanert SLE 96Wellplate(天津博纳艾杰尔)。MSPE 的 25-羟维生素 D 测定试剂盒(北京梅斯质谱生物)。

1.3 方法

1.3.1 LLE 法标本处理过程 按照常规的 LLE 操作流程进行操作, 首先将 100 μL 标本添加至小型离心管中, 再在其中加入 100 μL 含内标的甲醇, 然后添加 600 μL 乙酸乙酯, 震荡后离心取 400 μL 上清液, 氮吹后用 100 μL 初始流动相复溶。质控和标准品同步按操作处理。

1.3.2 SLE 法标本处理过程 SLE 法按 Cleanert SLE 96Wellplate 使用要求进行操作, 首先将 100 μL 标本加入预设的 96 孔处理板中的标本位置, 再在其中加入同位素内标, 然后每孔加入 100 μL 纯水稀释静置 5 min, 之后每孔采用 1 200 μL 正己烷淋洗, 收集淋洗液氮气吹干, 用 100 μL 初始流动相复溶。质控和标准品同步按操作处理。

1.3.3 MSPE 标本处理过程 按照试剂盒操作规程操作。首先将 100 μL 标本加入预设的 96 孔中的标本位置, 再在其中加入同位素内标, 之后将 96 孔板转移至梅斯 ZPTQ 32 仪器进行自动标本处理。质控和标本同步按操作处理。

1.3.4 LC-MS/MS 色谱柱采用 Kinetex 2.6 μm C¹⁸ 100A 30×2.1 mm 规格, 含 0.1% 甲酸的水溶液为流动相 A, 以含 0.1% 甲酸的甲醇为流动相 B, 采用梯度洗脱: 0~<0.3 min, 40% 流动相 A; 0.3~<1.5 min, 0%~<40% 流动相 A; 1.5~2.5 min, 0% 流动相 A; 2.5~3.5 min, 40% 流动相 A, 流速 0.5 mL/min。采用正离子大气压化学电离离子化的多反应监测模式, 25-(OH)D₂ 和 25-(OH)D₃ 定量离子通道质荷比分别为 395.2:269.3 和 383.3:365.3; 定性离子通道质荷比分别为 395.2:337.2 和 383.3:257.2; 内标离子通道质荷比分别为 398.2:272.3 和 389.3:371.3。离子源温度: 500 °C, 离子源电压 5 500 V, 气帘气 30, 雾化气 55, 辅助气 20。

1.4 性能验证 性能验证过程参考《液相色谱-质谱临床应用建议》^[11] 和《液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证》^[12] 指南。

1.4.1 线性、定量限和检测限评价 以标准溶液浓度为 X 轴, 标准品和内标峰面积的比值为 Y 轴, 进行线性回归分析, 经“1/X²”权重得回归方程。将样品待测物和内标的峰面积比代入标准曲线方程, 计算标本中 25-(OH)D₂ 和 25-(OH)D₃ 水平, $r>0.99$ 。以信噪比≥3 时的浓度设为检测限, 以信噪比≥10 时的浓度设为定量限, 且连续 10 次测定的变异偏差<20%。

1.4.2 精密度评价 混合血清标本, 平均分为 2 份, 其中 1 份作为低水平标本, 另 1 份添加适量标准品混合物作为高水平标本, 将 2 个水平标本混匀, 分装至冻存管, 置于 -80 °C 保存。每天各取出 1 支, 制备 8 个平行管, 测定 3 批次, 计算该方法的精密度。

1.4.3 绝对回收率评估 取来源于不同患者的血清标本, 每份不少于 1 mL, 震荡混匀备用。标本再分为空白对照和 MSPE 提取前加标准品[添加 2 个 10 μL 不同浓度标准品, 25-(OH)D₂ 为 3/13 ng/mL, 25-(OH)D₃ 为 5/30 ng/mL]和 MSPE 提取后加标准品[添加 2 个 10 μL 不同浓度标准品, 25-(OH)D₂ 为 3/13 ng/mL; 25-(OH)D₃ 为 6/30 ng/mL], 最终用水补齐复溶体积。比较磁珠提取前加标准品(去除空白本底)与 MSPE 提取后加标准品(去除空白本底)峰面积的差异。

1.4.4 相对回收率和准确度评估 通过测定混合血清和混合血清添加 25-(OH)D₂ 和 25-(OH)D₃ 的 2 个水平混合标准品溶液各 10 μL[加入标准品对应理论水平 25-(OH)D₂ 为 3/13 ng/mL, 25-(OH)D₃ 为 6/30 ng/mL], 每种处理各制备 3 个平行管, 计算加样

回收率及与预期浓度的偏差。

1.4.5 基质效应评估 采用标本处理后加入法。取 4 份来源于不同个体的血清标本,每份标本分为 3 份,经过 MSPE 提取,其中 1 份加入水,1 份加入 10 μ L 标准品 25-(OH) D₂ (3 ng/mL), 25-(OH) D₃ (6 ng/mL),另 1 份加入 10 μ L 标准品 25-(OH)D₂ (13 ng/mL),25-(OH)D₃ (30 ng/mL),3 份均加入 10 μ L 混合内标。标本中去除空白中的信号值后与溶剂中标准品峰面积(或峰面积内标比)进行比较,分析方法的基质效应。

1.4.6 方法比对 收集临床检测剩余血清标本 120 例,各待测物浓度在检测范围内分布相对均匀,采用 LLE、SLE 和 MSPE 同时进行处理,然后采用相同 LC-MS/MS 方法进行检测,比较 3 种提取方法检测结果的一致性。

1.5 统计学处理 采用 MedCalc 进行统计学分析和作图,采用 Bland&Altman 作图比较 3 种方法的差异,以 Passing & Bablok 回归分析 3 种方法之间的相关性。

表 1 MSPE 提取 LC-MS/MS 测定 25-(OH)D 的结果

目标物	低值混合血清			高值混合血清		
	均值 (ng/mL)	批内重复性 (%)	实验室内总 不精密度(%)	均值 (ng/mL)	批内重复性 (%)	实验室内总 不精密度(%)
25-(OH)D ₂	4.1	5.3	10.6	20.2	6.5	7.3
25-(OH)D ₃	15.1	5.1	8.0	53.1	6.8	6.1

2.2.3 绝对回收率 25-(OH) D₂ 绝对回收率在 27.7%~31.3%, 25-(OH) D₃ 绝对回收率在 21.7%~34.3%。

2.2.4 相对回收率和准确度 25-(OH)D₂ 和 25-(OH) D₃ 相对回收率分别在 97.0%~104.0%、96.5%~106.3%,百分偏差均在±15%以内,见表 2。

表 2 MSPE 提取 LC-MS/MS 测定 25-(OH)D 的结果

目标物	理论加入浓度 (ng/mL)	测定浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)	偏差 (%)
25-(OH)D ₂	3	2.91	97.0	-3.1
	13	13.53	104.0	3.9
25-(OH)D ₃	6	6.38	106.3	6.0
	30	28.94	96.5	-3.7

2.2.5 基质效应 25-(OH)D₂ 和 25-(OH)D₃ 在大气压化学电离检测下几乎没有基质效应的抑制,甚至还有些基质增强的趋势,另外经过同位素内标校正后,相对基质效应均在 100%左右,亦可抵消潜在的基质效应,见表 3。

2.2.6 方法比对 LLE、SLE 和 MSPE 这 3 种方法提取临床 120 例血清标本中 25-(OH)D₂ 和 25-(OH)

2 结 果

2.1 血清标本经 MSPE 提取后的典型色谱峰图 25-(OH)D₂ 和 25-(OH)D₃ 的出峰时间分别为 1.90 min、1.86 min,两种待测物峰形对称,各成分分离良好,互不干扰,且与 SLE 方法提取后的检测结果比较,MSPE 提取后未发现杂峰明显增多。

2.2 MSPE 提取 25-(OH)D₂ 和 25-(OH)D₃ 性能评价结果

2.2.1 线性、定量限和检测限 25-(OH)D₂ 和 25-(OH) D₃ 分别在 1.0~36.0 ng/mL,2.5~90.0 ng/mL 范围内相关性良好,*r* 在各批次均>0.99。25-(OH) D₂ 和 25-(OH) D₃ 检测限分别为 0.15 ng/mL、0.15 ng/mL;定量限分别为 0.4 ng/mL、0.9 ng/mL,对应变异系数分别为 11.71%、7.96%。

2.2.2 精密度 25-(OH)D₂ 和 25-(OH)D₃ 批内重复精密度分别在 5.3%~6.5%、5.1%~6.8%;实验室内总不精密度分别在 7.3%~10.6%、6.1%~8.0%,见表 1。

D₃ 的结果比较,其中 SLE 和 MSPE 相关性均良好(*r*>0.99),2 种方法比较 25-(OH)D 相对百分偏差在±15%以内,LLE 和 MSPE 相对来说结果偏差较大(*r*>0.98),2 种方法比较 25-(OH)D 相对百分偏差在±25%以内。见图 1~4。

表 3 MSPE 提取 LC-MS/MS 检测 25-(OH)D 的基质效应(%)

目标物	低浓度加标组		高浓度加标组	
	绝对 基质效应	相对 基质效应	绝对 基质效应	相对 基质效应
25-(OH)D ₂				
标本 1	108.7	101.4	120.0	95.9
标本 2	118.4	98.6	118.0	86.9
标本 3	127.4	107.2	131.9	102.5
标本 4	114.7	100.0	127.0	97.8
25-(OH)D ₃				
标本 1	94.6	97.3	127.2	104.2
标本 2	101.0	91.2	119.7	88.5
标本 3	100.5	89.2	129.0	97.3
标本 4	112.8	102.3	134.3	105.6

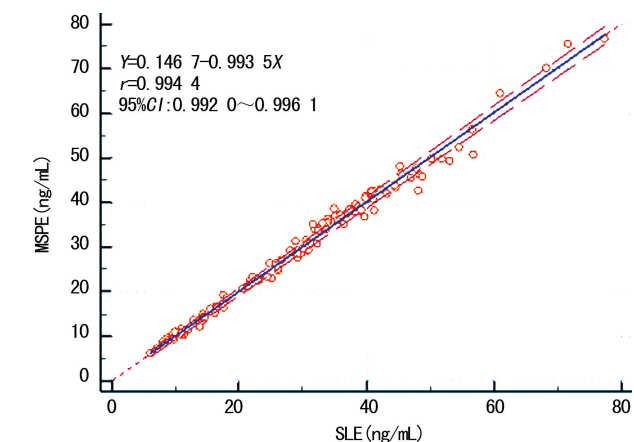


图 1 MSPE 和 SLE 结果的相关性

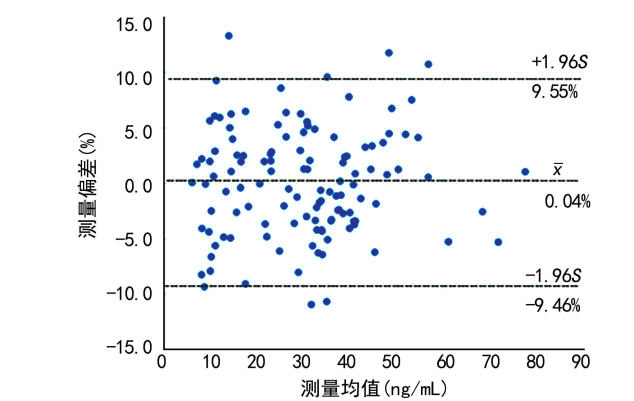


图 2 MSPE 和 SLE 的 Bland&Altman 分析

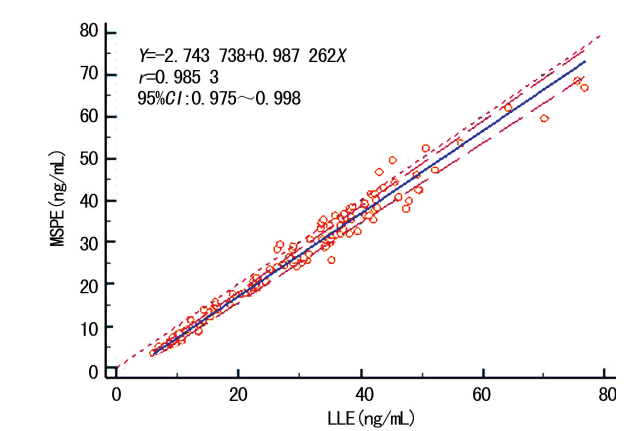


图 3 MSPE 和 LLE 结果的相关性

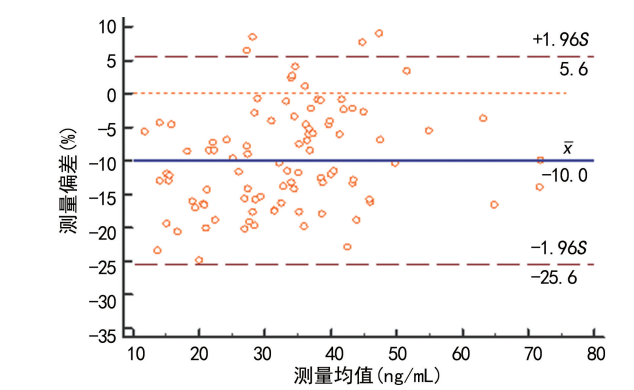


图 4 MSPE 和 LLE 的 Bland&Altman 分析

3 讨 论
目前免疫法和色谱法是检测血清中 25-(OH)D

常用的方法,免疫法中有放射免疫法、酶联免疫吸附试验、化学发光免疫测定法及电化学发光免疫测定法^[13],色谱法中包括高效液相色谱法和 LC-MS/MS^[9-12]。其中,免疫类方法的优点是初始投入成本低、高自动化、重现性好,然而特异度和灵敏度不高,不能准确测定 25-(OH)D₂ 水平,测试标本后期成本较高,回收率较差等是其不可避免的缺点;高效液相色谱法优点是分离效果好、速度快等,缺点是灵敏度不高、且不能很好的定性等;LC-MS/MS 具有灵敏度高、特异度强、准确度高的特点,能同时监测 25-(OH)D₂ 和 25-(OH)D₃,缺点是对检测人员技术要求高,仪器成本高^[14-15]。LC-MS/MS 技术检测 25-(OH)D 已受到临床医生及检验人员的共同认可,然而复杂的前处理过程限制了 LC-MS/MS 在临床的广泛应用,MSPE 技术的出现为 LC-MS/MS 技术的自动化进程带来了革命性的突破。

目前,LC-MS/MS 方法进行检测前均需要进行标本前处理。目前常用的前处理方法主要有固相萃取、液液萃取(包括 SLE)、蛋白沉淀及免疫捕获等。对于水平较低的 25-(OH)D 及激素类物质往往需要使用较为繁琐的前处理方法,对实验室仪器配置和操作人员要求较高,并且不利于实现完全自动化。

本研究中 MSPE 通过在磁珠表面进行化学基团修饰,待测物与磁珠表面键合相发生吸附解吸附,模拟固相萃取的过程,其不同于免疫试剂中抗体包被 MSPE 的原理。首先活化平衡磁珠,然后加入待测标本,经过充分混合后,待测物与磁珠互相吸附,之后通过不同极性强度的洗脱溶液对磁珠淋洗洗脱,以达到分离和纯化的目的。MSPE 有别于传统固相萃取,通过磁珠的转移来实现目标待测物的分离,不仅过程简单,自动化程度高,MSPE 和 LC-MS/MS 联合使用有望成为一种前处理和检测分析一体的全自动检测方法。

综上所述,本研究验证了 MSPE 提取 25-(OH)D 的性能,MSPE 和 SLE 这两种提取方法具有良好相关性,所得结果基本一致。MSPE 有望在未来规模化应用于 LC-MS/MS 的自动化前处理过程,减少手工操作的误差,助力于临床应用。

参考文献

[1] 顿中华. 维生素 D 检测方法的研究进展[J]. 华夏医学, 2016,29(4):171-176.

[2] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 血清 25-羟基维生素 D3 检测操作指南同位素稀释液相色谱串联质谱法: WS/T478-2015[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.

[3] GUILLAUME J, JEAN S, CHARLES C. Vitamin D in chronic kidney disease and dialysis patients[J]. Nutrients, 2017,9(4):722.

[4] BERRIDGE M J. Vitamin D deficiency and diabetes[J]. Biochem J, 2017,474(8):1321-1332. (下转第 1243 页)

- the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats; relevance to autism spectrum disorder[J]. *Behav Brain*, 2011, 217(1):47-54.
- [2] MACFABE D F. Short-chain fatty acid fermentation products of the gut microbiome; implications in autism spectrum disorders[J]. *Microb Ecol Health Dis*, 2012, 23:1-3.
 - [3] NGUYEN T T, KOSCIOLEK T, EYLER L T, et al. Overview and systematic review of studies of microbiome in schizophrenia and bipolar disorder[J]. *J Psychiatr Res*, 2018, 99:50-61.
 - [4] BABULAS V, FACTOR-LITVAK P, GOETZ R, et al. Prenatal exposure to maternal genital and reproductive infections and adult schizophrenia[J]. *Am J Psychiatry*, 2006, 163(5):927-929.
 - [5] DUNCAN S H, LOUIS P, FLINT H J. Cultivable bacterial diversity from the human colon[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2007, 44(4):343-350.
 - [6] FENG Y, WANG Y, WANG P, et al. Short-chain fatty acids manifest stimulative and protective effects on intestinal barrier function through the inhibition of NLRP3 inflammasome and autophagy[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(1):190-205.
 - [7] SCHWARZ E, MAUKONEN J, HYYTIÄINEN T, et al. Analysis of microbiota in first episode psychosis identifies preliminary associations with symptom severity and treatment response[J]. *Schizophr Res*, 2018, 192:398-403.
 - [8] ZHENG P, ZENG B, LIU M, et al. The gut microbiome from patients with schizophrenia modulates the glutamate-glutamine-GABA cycle and schizophrenia-relevant behaviors in mice[J]. *Sci Adv*, 2019, 5(2):8317.
 - [9] KHAITOVICH P, LOCKSTONE H E, WAYLAND M T, et al. Metabolic changes in schizophrenia and human brain evolution[J]. *Genome Biol*, 2008, 9(8):124.
 - [10] SHAH P, NANKOVA B B, PARAB S, et al. Short chain fatty acids induce TH gene expression via ERK-dependent phosphorylation of CREB protein[J]. *Brain Res*, 2006, 1107(1):13-23.
 - [11] 曲颖, 陆伦根. 胆汁酸、微生物和代谢[J]. *肝脏*, 2019, 24(1):12-13.
 - [12] 曹媛媛, 王春生, 高淑英, 等. 养心汤联合氮氮平治疗复发精神分裂症的效果[J]. *中国保健营养*, 2016, 13(10):119-122.
 - [13] TANSEY K E, OWEN M J, O'DONOVAN M C, et al. Schizophrenia genetics: building the foundations of the future[J]. *Schizophr Bull*, 2015, 41(1):15-19.
 - [14] NGUYEN T T, KOSCIOLEK T, EYLER L T, et al. Overview and systematic review of studies of microbiome in schizophrenia and bipolar disorder[J]. *J Psychiatr Res*, 2018, 99:50-61.
 - [15] SCHWARZ E, MAUKONEN J, HYYTIÄINEN T, et al. Analysis of microbiota in first episode psychosis identifies preliminary associations with symptom severity and treatment response[J]. *Schizophr Res*, 2018, 192:398-403.
 - [16] KONG X, WANG R, XUE Y, et al. Sirtuin 3, a new target of PGC-1 α , plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis[J]. *PLoS One*, 2010, 5(7):e11707.
 - [17] ALEMAN J O, BOKULICH N A, SWANN J R, et al. Fecal microbiota and bile acid interactions with systemic and adipose tissue metabolism in diet-induced weight loss of obese postmenopausal women[J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1):244.

(收稿日期:2021-10-23 修回日期:2022-01-21)

(上接第 1237 页)

- [5] VELOUDI P, JONES G, SHARMAN J E, et al. Effectiveness of vitamin D supplementation for cardiovascular health outcomes[J]. *Pulse(Basel)*, 2016, 4(4):193-207.
- [6] 李水军, 王思合. 液相色谱-串联质谱技术的临床应用进展[J]. *临床检验杂志*, 2016, 34(12):881-884.
- [7] 曹正, 李水军, 沈敏, 等. 液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证[J]. *检验医学*, 2019, 34(3):9-16.
- [8] 方春雪, 位鸿, 何蕊, 等. 液相色谱串联质谱临床应用进展[J]. *长春中医药大学学报*, 2016, 32(2):405-406.
- [9] 张春花. 质谱分析在遗传代谢性疾病临床检验诊断中的应用[J]. *检验医学*, 2015, 30(5):410-415.
- [10] 周琰, 潘柏申. 维生素 D 检测标准化进程[J]. *检验医学*, 2016, 31(1):83-87.
- [11] 中华医学会检验医学分会, 卫生计生委临床检验中心. 液相色谱-质谱临床应用建议[J]. *中华检验医学杂志*, 2017, 40(10):770-778.
- [12] 中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会. 液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证[J]. *检验医学*, 2019, 34(3):189-196.
- [13] 高海丽, 莫俊鑫, 龚春梅, 等. 直接化学发光免疫法测定血清 25 羟基维生素 D 的性能验证[J]. *卫生研究*, 2019, 48(4):633-637.
- [14] 战思恩, 李幽然, 刘颖, 等. 液相色谱串联质谱法检测微量血维生素 D 含量[J]. *标记免疫分析与临床*, 2019, 26(8):1366-1369.
- [15] 郑仁锦, 华永有, 林守二, 等. 同位素标记-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定血清 25-羟基维生素 D-3[J]. *现代医药卫生*, 2019, 35(16):2438-2440.

(收稿日期:2021-11-12 修回日期:2022-02-28)